



12-11-00 09/719336 PCT
5271 18 DEC PTO 08 DEC 2000

PATENT APPLICATION


IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In the United States Patent Application of:

Applicant:	VON KNEBEL-DOEBERITZ, Magnus KLEIN-BAUERNSCHMITT, Petra ZUR HAUSEN, Harald SCHLEHOFER, Jorg	Atty. Docket No.:	4121-121
U.S. Application No.:	New U.S. National Stage Application of PCT International Application. No. PCT/DE99/01711	Examiner:	Not yet assigned
Date Filed:	December 8, 2000	Group Art Unit:	Not yet assigned
International Filing Date:	8 June 1999	Paper No.:	1
Priority Date Claimed:	8 June 1998 (German Application No. 198 25 620.5)		
Title:	USE OF ADENO-ASSOCIATED VIRUSES FOR DECREASING THE RADIOTHERAPY-INDUCED OR CHEMOTHERAPY-INDUCED RESISTANCE IN CANCER PATIENTS		

EXPRESS MAIL CERTIFICATE

It hereby is certified by the person identified below that the attached documents are being mailed to the Commissioner of Patents on the date specified, in an envelope addressed to the Commissioner of Patents, Box PATENT APPLICATION, Washington, DC 20231, and Express Mailed under the provisions of 37CFR 1.10.


Blake Crouch

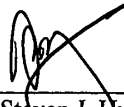
December 8, 2000
Date

EL468271268US
Express Mail Label Number

**SUBMISSION UNDER 37 CFR 1.53 AND 35 U.S.C. 371 OF UNITED STATES PATENT
APPLICATION (NATIONAL PHASE PROCEEDINGS) BASED ON INTERNATIONAL
APPLICATION NO. PCT/DE99/01711 AND CLAIMING PRIORITY OF GERMAN PATENT
APPLICATION NO. 198 25 620.5**

09/719330
528 ec'd PCT/PTO 08 DEC 20

Commissioner for Patents
Box PATENT APPLICATION
Washington, DC 20231



Steven J. Hultquist
Registration No. 28,021
Attorney for Applicant

**INTELLECTUAL PROPERTY/
TECHNOLOGY LAW**
P.O. Box 14329
Research Triangle Park, NC 27709
Phone: (919) 419-9350
Fax: (919) 419-9354
File No.: 4121-121;

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PRIORITY
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

REC'D 01 SEP 1999	
WIPO	PCT

EJV

DE 99/1711

Bescheinigung

Die Anmelderin Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des öffentlichen Rechts in Heidelberg/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verwendung von adenoassoziierten Viren zur Senkung der radio- oder chemotherapieinduzierten Resistenz bei Krebspatienten"

am 8. Juni 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol A 61 K 48/00 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 15. Juli 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Niet...

Aktenzeichen: 198 25 620.5

Anmelder: Deutsches Krebsforschungszentrum
Unser Zeichen: K 2537 - hu / msl

Verwendung von adenoassoziierten Viren zur Senkung der radio- oder chemotherapieinduzierten Resistenz bei Krebspatienten

- 5 Die Erfindung betrifft die Verwendung von adenoassoziierten Viren zur Senkung der radio- oder chemotherapieinduzierten Resistenz bei Patienten, die an einem durch Radio- oder Chemotherapie zu behandelnden Krebs leiden.

10 Die Therapie maligner Erkrankungen erfolgte bisher neben der chirurgischen Entfernung von Tumoren durch Radio- und/oder Chemotherapie. Der Einsatz zytostatischer Agentien wird jedoch durch das Auftreten von Nebenwirkungen, insbesondere durch die Ausbildung von Resistenzen, limitiert. Bedingt durch diese Nebenwirkungen können Chemotherapeutika nur in begrenztem Umfang eingesetzt werden. So kann nicht mehr als eine vom Patienten tolerierbare
15 Dosierung des Chemotherapeutikums eingesetzt werden, die aber in den meisten Fällen nur einen geringen kurativen Effekt erzielt.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, das Problem der durch Radio- oder Chemotherapie induzierten Resistenz zu vermindern bzw.
20 abzuschwächen. Dadurch soll die Überlebensrate von Krebspatienten nach einer Radio- oder Chemotherapie verbessert werden. Ferner sollen die Folgedosen bei einer Radio- oder Chemotherapie gesenkt werden können. Weiterhin soll die Ansprechbarkeit von Tumorzellen auf Radio- oder Chemotherapie verbessert

werden.

Diese Aufgabe wird durch die Gegenstände der Patentansprüche gelöst.

5 Erfindungsgemäß wird durch die Verwendung von adenoassoziierten Viren die Ausbeildung einer radio- oder chemotherapieinduzierten Resistenz bei Patienten, die an einem durch Radio- oder Chemotherapie zu behandelnden Krebs leiden, gesenkt.

10 Überraschenderweise wurde gefunden, daß nach einer Behandlung mit humanen apathogenen adenoassoziierten Viren (AAV) die Tumorzellen besser auf eine nachfolgende chemo- oder radiotherapeutische Maßnahme ansprechen.

15 Das AAV-Virus ist ein humanes Parvovirus, das eine Koinfektion mit einem Helfervirus benötigt, damit eine produktive Infektion stattfinden kann. AAV infiziert Menschen in früher Kindheit und gilt als apathogen, da keine menschliche Krankheit mit der AAV-Infektion verbunden werden konnte (Adv. in Vir. Res. 1987, 32, 43-306).

20 Eine Infektion mit AAV in Kombination mit chemo- oder radiotherapeutischen Maßnahmen steigert nach Erkenntnis der Erfinder die Effizienz der herkömmlichen Therapie und vermindert auftretende Resistenzen, so daß eine weitere Therapie erfolgversprechender als bisher durchgeführt werden kann. Erfindungsgemäß können beliebige AAV-Viren verwendet werden. Bevorzugt wird
25 das AAV-2-Virus verwendet.

In Tierversuchen mit immundefizienten Nacktmäusen, denen subkutan kleinzellige Bronchialkarzinomzellen implantiert wurden, konnte gezeigt werden, daß eine AAV-Infektion, die gleichzeitig mit einer chemotherapeutischen Behandlung vorgenommen wurde, zu einem schnelleren Rückgang der Tumoren führte. In
5 beiden Gruppen zeigten sich nach kurzer Zeit Rezidive. Diese sprachen jedoch in der AAV-infizierten chemotherapierten Gruppe auf eine erneute Chemotherapie besser an als in der nur chemotherapierten Gruppe. Daraus läßt sich erkennen, daß eine Infektion mit AAV die Ausbildung von Resistenzen vermindert oder sogar vermeidet.

10

Die erfindungsgemäße Verwendung der AAV-Viren kann vor, gleichzeitig oder nach der chemo- oder radiotherapeutischen Behandlung erfolgen. Sie erfolgt jedoch bevorzugt nach einem ersten chemo- oder radiotherapeutischen Behandlungszyklus. Insbesondere bei Tumorarten, die per se schlecht auf eine chemo-
15 oder radiotherapeutische Behandlung ansprechen, kann es angezeigt sein, die Behandlung vor der oder begleitend zu der Chemo-/Radiotherapie durchzuführen, um die Effizienz der Behandlung zu erhöhen. Dadurch können die Behandlungsdosen gesenkt werden, wodurch die Nebenwirkungen vermindert werden können.

20

Die Radio- oder Chemotherapie kann eine beliebige Radio- oder Chemotherapie sein, die dem zu behandelnden Krebs angepaßt ist. Solche Therapien sind seit Jahren bekannt und neben der chirurgischen Entfernung des Tumors die etablierte Methode, um Krebserkrankungen zu heilen bzw. die Lebenserwartung eines
25 Patienten um einige Zeit zu erhöhen. Dem Fachmann sind deshalb die Maßnah-

men einer Radio- oder Chemotherapie bestens bekannt.

Die erfindungsgemäße Verwendung der AAV-Viren kann auf beliebige Krebsarten wie angewendet werden, wobei beste Erfolge bei Colon-, Pankreas- und Hirntumoren (insbesondere Glioblastom) zu erwarten sind. Bevorzugt ist das kleinzellige Lungenkarzinom (SCLC) damit behandelbar.

Die erfindungsgemäße Verwendung erfolgt intravenös, per infusionem, intratumoral, oral (auch per inhalationem) oder kutan. Dabei wird das Virus in einem geeigneten, dem Verabreichungsweg angepaßten Präparat formuliert. So ist es bevorzugt für eine intravenöse (auch als Infusion) und intratumorale Verabreichung das Virus in einer physiologischen Kochsalzlösung, Ringerlösung oder PBS-Lösung (Phosphat-gepufferte Salzlösung), für eine kutane Verabreichung in Form einer Salbe, Suspension oder Gel, für eine orale Verabreichung in Form von Aerosolspray bereitzustellen.

Die verwendete Virusdosis beträgt abhängig vom Körpergewicht des Patienten 10^9 - 10^{10} AAV-Partikel/kg KG.

Erfindungsgemäß wird auch eine pharmazeutische Zusammensetzung bereitgestellt, die neben dem Chemotherapeutikum (Zytostatikum) adeno-assoziierte Viren, insbesondere AAV-2, enthält. Als Chemotherapeutikum sind alle bisher in der Tumorthherapie gebräuchlichen Chemotherapeutika (Zytostatika) einzeln oder in Kombination einsetzbar, beispielsweise Cis-Platin, Etoposid, Methothrexat, Doxorubicin, Cyclophosphamid, Trofosfamid, Busulfan, Cytarabin, Fluoruracil,

5 Mercaptopurin, Vinblastinsulfat, Vincristinsulfat, Bleomycinsulfat oder Mitomycin. So ist es bevorzugt für eine intravenöse (auch per infusionem) und intratumorale Verabreichung eine Injektionslösung, für eine kutane Verabreichung in Form einer Salbe, für eine orale Verabreichung in Form von Aerosolspray bereitzustellen. Als Basis für die Bereitung der Infusionslösung eignen sich jeweils in reiner Form oder als Mischung physiologische Kochsalzlösung, Ringerlösung oder PBS. Die Menge an AAV richtet sich nach dem Gewicht des Patienten und beträgt 10^9 - 10^{10} Partikel/kg KG. In der pharmazeutischen Zusammensetzung ist diese in einer Menge für ein mittleres Körpergewicht von 70 kg enthalten. Die genaue Dosierung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung wird vom Arzt festgelegt und ist abhängig vom Geschlecht und Gewicht des Patienten, Schwere der Krankheit, Art der Verabreichung und geplanter Dauer der Verabreichung. Eine erfindungsgemäße Zusammensetzung kann auch übliche Hilfsstoffe enthalten. Als Hilfsstoffe können die üblichen, wie Arzneimittelträger, Bindemittel, Sprengmittel, Gleitmittel, Lösungsmittel, Lösungsvermittler, Freigabe-Beschleuniger, Freigabe-Verzögerer, Emulgatoren, Stabilisatoren, Färbemittel, 15 Bindemittel, Sprengmittel, Gleitmittel, Lösungsmittel, Lösungsvermittler, Freigabe-Beschleuniger, Freigabe-Verzögerer, Emulgatoren, Stabilisatoren, Färbemittel der Geschmackskorrgenzen verwendet werden.

Die Erfindung wird anhand der beigefügten Figuren näher erläutert.

20

Figur 1 zeigt eine schematische Darstellung des zur Bestimmung von AAV-2 vermittelter Arzneimittel-sensibilisierung verwendete Protokoll. Die Proliferation der SCLC-Zelllinien nach der Infektion und/oder Arzneimittelbehandlung wurde mit dem MTT-Assay (J. Immunol. Methods 1983, 56, S. 55-63) bestimmt. Die relative Proliferation (A/Ao) wurde durch das Verhältnis der Absorption von 25

AAV-2-infizierten und/oder mit dem Arzneimittel behandelten Zellen (A) zu der Absorption von pseudoinfizierten, unbehandelten Zellen (Ao) berechnet.

Die Figuren 2a + b zeigen die AAV-vermittelte Sensibilisierung der SCLC-Zelllinien gegenüber Cis-Platin, die relative Proliferation (A/Ao) der SCLC-Zelllinien, NCI-H209 (Figur 2a) und NCI-H446 (Figur 2b) nach Pseudoinfektion (a: PBS allein; b: infiziert mit einem hitzeinaktivierten Gradienten von Ad2-infizierten Zellen) oder Infektion mit verschiedenen Multiplizitäten einer Infektion mit AAV-2 mit (graue Säulen) oder ohne (weiße Säulen) anschließende Behandlung mit IC50 von Cisplatin gemäß Tabelle 1 (TCID, in der Gewebekultur infektiöse Dosis).

Die Figur 3 zeigt die AAV-vermittelte Sensibilisierung von von NCI-H209-Zellen abgeleiteten Tumoren in Nacktmäusen (5 Mäuse pro Gruppe). Die Dosis an Cis-Platin war 3 mg/kg Körpergewicht (wöchentliche Verabreichung). Die Etoposid-Dosis betrug 7,5 mg/kg Körpergewicht (dreimal wöchentlich verabreicht). AAV-2 wurde in einer MOI von 10^8 TCID/Tier wöchentlich verabreicht. Pfeile zeigen die Änderung der Behandlungsmodalitäten an: - Unterbrechung der Arzneistoffbehandlung und AAV-2-Infektion; + Beginn der Behandlung und der Infektion.

Die Erfindung wird am Beispiel des kleinzelligen Lungenkarzinoms (SCLC) näher erläutert. Dieser Karzinomtyp ist im allgemeinen durch eine anfänglich effektive Chemotherapie und Remission des Tumors gekennzeichnet. Jedoch erleiden fast alle Patienten ein Rezidiv, das durch eine Resistenz der Tumorzellen gegenüber der zuerst angewendeten Chemotherapie entstanden ist (üblicherweise Cisplatin/Etoposid). Daher wurde in einem Modellsystem mit einer menschlichen

kleinzelligen Lungenkarzinom-Zelllinie getestet, ob eine Infektion mit AAV die zytotoxische Wirkung der Chemotherapeutika in der Zellkultur und in Tumoren bei immungestörten Mäusen verstärkt. Es wird gezeigt, daß die Infektion mit AAV signifikant die Wirksamkeit der chemotherapeutischen Behandlung an SCLC-Tumorzellen und -Tumoren erhöht.

Beispiel 1

Sensibilisierung von SCLC-Zelllinien gegenüber Cis-Platin und Etoposid durch AAV-Infektion

Kleinzellige Lungenkrebszelllinien (NCI-H69, NCI-H164, NCI-H209 und NCI-H446) (Cancer Res., 1980, 40, 3502-3507; Cancer Res., 1985, 45, 2913-2923) wurden in RPMI-1640-Medium (Eurobio, Raunheim, Deutschland) gezüchtet. HeLa-Zellen wurden in DMEN (Eurobio, Raunheim, Deutschland) gezüchtet. Alle Wachstumsmedien wurden mit Glutamin (Eurobio, 1%), Antibiotika (Penicillin und Streptomycin) und 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (PAA, Linz, Österreich) supplementiert. Die Kulturen wurden bei 37°C in einer Feuchtatmosphäre mit 5% CO₂ inkubiert und regelmäßig auf Mycoplasmenverunreinigungen getestet.

Das adeno-assoziierte Virus Typ 2 (AAV-2) wurde in HeLa-Zellen unter Verwendung von Adenovirus Typ 2 (Ad-2) als Helfer vermehrt. AAV wurde in einem Cäsium-chloridgradienten gereinigt und wie in J. Gen. Virol., 1994, 74, 2655-2662 beschrieben titriert. Die Adenovirus Typ 2 Inokula waren geklärte Über-

stände von Ad2-infizierten HeLa-Zellen.

Die SCLC-Zellen wurden in PBS suspendiert und mit gereinigtem AAV-2 in den angegebenen Multiplizitäten der Infektion (MOI) inkubiert. Nach 45 min bei 37°C wurde nichtgebundenes, absorbiertes Virus durch Waschen mit PBS entfernt und das Wachstumsmedium wurde ergänzt. Als Kontrollen (Pseudoinfektion) wurden entweder PBS oder die hitzeinaktivierte Fraktion (56°C, 30 min.) eines CsCl-Gradienten von mit Ad-2 infizierten Zellen alleine verwendet, wobei die Dichte (1,14 g/cm³) der AAV-2-haltigen Fraktion, die bei der AAV-2-Reinigung verwendet wurde, in den jeweiligen Experimenten angegeben ist. Das Volumen/Zell-Verhältnis bei diesen Experimenten war 50mal größer (5ml/10⁶ Zellen) als das, das für die AAV-Infektionen verwendet wurde.

Die AAV-2- oder pseudoinfizierten Zellen wurden mit Cis-Platin (Astra Medica, Frankfurt/Main, Deutschland) oder Etoposid (Bristol, München, Deutschland) oder beiden in einem Verhältnis [Cisplatin: Etoposide = 1:2,5] behandelt, wobei die Arzneistoffe aufgelöst in PBS dem Medium in der angegebenen Konzentration zugesetzt wurde.

Die Proliferation der SCLC-Zellen nach der Infektion mit AAV-2 und/oder Behandlung mit Chemotherapeutika wurde durch den modifizierten MTT-Test bestimmt (J. Immunol. Methods, 1983, 56, 55-63). Nach der Infektion oder Pseudoinfektion wurden die Zellen in Platten mit 24 Kavitäten in einer Dichte von 10⁵ Zellen/Kavität ausgebracht und mit den Chemotherapeutika in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Nach sechs Tagen (NCI-H69, NCI-H446) bzw. acht

Tagen (NCI-H146, NCI-H209) wurde der Kultur MTT ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; Sigma, Deisenhofen, Deutschland) bis zu einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml zugesetzt. Die Kulturen wurden dann 4 h bei 37°C inkubiert, um eine Reduktion von MTT zu blauem Formazan durch mitochondriale Dehydrogenasen (Arch. Biochem. Biophys., 1993, 303, 474-482) zu erlauben, was eine aktive Proliferation der Zellen anzeigt. Die Zellen wurden zentrifugiert, mit PBS gewaschen und Formazan wurde in Isopropanol solubilisiert. Die ausgefällten Proteine wurden durch Zentrifugation (1000 UpM, 15 min) pelletiert und 200 µl-Proben des Überstands wurden gemessen, um die optische Dichte bei 540 nm (OD540) zu bestimmen, wobei die OD690 als Referenz und ein Titertek Multiskan plus MKII-Densitometer verwendet wurden (Lab Systems, Finnland).

Die relative Proliferation (A/Ao) wurde als das Verhältnis der in dem Überstand von AAV-2-infizierten und/oder mit Arzneistoff behandelten Zellen gemessene Absorption (A), verglichen mit der Absorption, die für den Überstand der pseudoinfizierten Zellen und unbehandelten Kontrollzellen gemessen wurde (Ao) definiert. Der IC50-Wert wurde als die Arzneistoff-Konzentrationen, die zu einer 50%-igen Hemmung der Proliferation führten, definiert.

Die mit AAV-2 infizierten Zellen (MOI-Werte wie angegeben) oder pseudoinfizierten Zellen wurden in Platten mit 24 Kavitäten ausgebracht und mit Cisplatin behandelt. Nach sechs bzw. acht Tagen wurde die relative Proliferation bestimmt. Zusätzlich wurden kinetische Studien durchgeführt, um die optimalen Behandlungsmodalitäten für SCLC-Zellen nach einer AAV-Infektion zu bestimm-

men. In diesen Untersuchungen wurde gezeigt, daß die AAV-vermittelte Sensibilisierung eine bis drei Stunden nach der Infektion maximal war. Bei dieser Untersuchung wurden die Chemotherapeutika drei Stunden nach der AAV-Infektion verabreicht. Um Effekte, die auf nach der Reinigung mit dem CsCl-Gradienten und der Ad2-Hitzeinaktivierung noch vorhandene Faktoren zurückzuführen sind, auszuschließen, wurde eine Kontrolle der Pseudoinfektion mit PBS zusätzlich zu der Pseudoinfektion mit der Fraktion des jeweiligen Gradienten eines Zellysats von mit Ad2 infizierten Zellen durchgeführt.

Es wurde die relative Proliferation von NCI-H209- und NCI-H446-SCLC-Zellen nach der Infektion mit verschiedenen Vielfachen der infektiösen Einheiten (MOI) von AAV-2 (10^1 - 10^5 in der Gewebekultur infektiöse Dosis (TCID) pro Zelle) mit und ohne anschließende Behandlung mit Cisplatin bei den in Tabelle 1 aufgeführten IC50-Werten gemessen.

Tabelle 1

Konzentration der Chemotherapeutika, die zu einer 50%-igen Hemmung der Proliferation (IC50) der SCLC-Zelllinien führen

NCI-H69	0,2	0,26	0,08/0,2
NCI-H146	0,11	0,025	0,008/0,02

NCI-H209	0,007	0,053	0,006/0,015
NCI-H446	0,15	0,21	0,042/0,105

5

Wie in Tabelle 1 gezeigt, zeigten die SCLC-Zelllinien NCI-H69 und NCI-H446 eine hohe intrinsische Resistenz gegenüber beiden Arzneimitteln, wobei die Empfindlichkeit gegenüber der Cisplatin/Etoposide-Behandlung niedriger war, wohingegen NCI-H146-Zellen gegenüber Etoposide hoch empfindlich waren und die NCI-H209-Zellen gegenüber beiden Arzneistoffen hoch empfindlich waren.

10

15

Wie aus Figur 2 (a + b) hervorgeht, führte die AAV-2-Infektion zu einer Abnahme der Proliferationsrate der mit Cisplatin behandelten Zellen bei einer MOI von 10^3 bis 10^4 TCID/Zelle. Die Infektion mit einer MOI von 10^5 TCID/Zelle führte zu keiner weiteren Verstärkung. Keine signifikante Hemmung der Proliferation wurde nach der Infektion mit niedrigeren MOI-Werten von AAV-2 oder nach der Pseudoinfektion beobachtet, was eine spezifische Wirkung infolge der Infektion mit hoher MOI von AAV-2 anzeigt. Die relative Proliferation in AAV-2 infizierten (10^{3-5} AAV/Zelle) und mit Cisplatin behandelten (IC50) Zellen wurde auf 0,29 in NCI-H446-Zellen und auf 0,25 in NCI-H209-Zellen verglichen mit der relativen Proliferation in nur mit Cisplatin behandelten (IC50) Zellen (0,59 in NCI-H446-Zellen und 0,5 in NCI-H209-Zellen) erniedrigt.

20

25

Beispiel 2

Quantitative Bestimmung der AAV-2-vermittelten Arzneistoffsensibilisierung von SCLC-Zelllinien

5

Um die Sensibilisierung von Zellen gegenüber Chemotherapeutika nach Infektion mit AAV-2 quantitativ zu bestimmen, wurden Dosis-Antwort-Kurven aufgestellt. Es wurde die relative Proliferation der Zelllinien nach einer Pseudoinfektion (PBS) oder AAV-Infektion mit 10^3 oder 10^4 TCID/Zelle und anschließende Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von Cisplatin oder Etoposide oder eine Kombination beider Arzneimittel bestimmt (Tabelle 2).

10

Tabelle 2

15 Sensibilisierungsfaktor von SCLC-Zelllinien, die mit Cisplatin und/oder Etoposide behandelt und mit AAV infiziert wurden.

20

Zelllinie	Chemotherapeutikum	Sensibilisierungs-faktor (A/Ao) * 10 ⁴ Ip. AAV/Zelle
NCI-H69	Cisplatin	1,43
	Etoposide	1,30
	Cisplatin/Etoposide	1,45

NCI-H146	Cisplatin	1,37
	Etoposide	1,38
	Cisplatin/Etoposide	1,33
NCI-H209	Cisplatin	2,33
	Etoposide	2,12
	Cisplatin/Etoposide	2,00
NCI-H446	Cisplatin	2,50
	Etoposide	3,00
	Cisplatin/Etoposide	3,00

*Die relative Proliferation (A/A_0) wurde durch das Verhältnis der Absorption von mit AAV-2-infizierten und/oder mit Arzneistoff behandelten (A) Zellen zu der Absorption der pseudoinfizierten, unbehandelten Kontrollen (A_0) berechnet

Die Sensibilisierungsfaktoren (SF) wurden als das Verhältnis der IC₅₀-Werte infizierter Zellen verglichen mit den IC₅₀-Werten pseudoinfizierter Zellen definiert. Der Sensibilisierungsfaktor gibt den Faktor an, um den die Konzentration eines Chemotherapeutikums nach Infektion mit AAV-2 erniedrigt werden kann, um den gleichen Grad an Proliferationshemmung zu erhalten. Wie in Tabelle 2 zusammengefaßt war die Sensibilisierung durch AAV-2 in NCI-H69 und NCI-H146 mäßig (maximaler SF etwa 1,4 bei einer MOI von 10^4 TCID/Zellen). Die Infektion von NCI-H209 oder NCI-H446 induzierte eine signifikantere MOI-

abhängige Sensibilisierung (maximaler SF etwa 3 (NCI-H446) und 2,3 (NCI-H209) bei einer MOI von 10^4 TCID/Zelle). Die AAV-2 vermittelte Sensibilisierung hing von dem verwendeten Chemotherapeutikum nicht ab.

5

Beispiel 3

AAV-2-vermittelte Arzneistoffsensibilisierung von NCI-H209-abgeleiteten Tumoren in Nacktmäusen

10

H209 ist eine Zelllinie, die von einem Tumor abgeleitet ist, der vor der Züchtung nicht chemotherapeutisch behandelt wurde und nicht arzneimittelresistent ist.

15

Weibliche Nacktmäuse (CD1-nu/nu) von Iffa Credo (Brüssel, Belgien) wurden in Isolatoren gehalten und erhielten Wasser und Nahrung nach Belieben. Experimentell wachsende SCLC-Zellen (H209) wurden subcutan den sechs Wochen alten Mäusen (10^7 Zellen in 100 μ l PBS pro Tier) in die Flanke injiziert. Fünf Monate nach der Inokulation der Zellen, als die Tumore ein Durchschnittsvolumen von 200 mm³ erreicht hatten, wurden die Tiere wöchentlich mit AAV-2 (intratumorale Injektion von 10^8 in der Gewebekultur infektiösen Dosen (TCID)) infiziert und/oder mit Chemotherapeutica durch intraperitoneale Injektion von 3 mg/kg Körpergewicht Cis-Platin (wöchentlich) und 7,5 mg/kg Körpergewicht Etoposid (dreimal wöchentlich) behandelt. Einzelheiten des Beginns und des Endes der Behandlung sind in Figur 3 angegeben. In jeder Gruppe (Kontrolle, chemotherapeutische Behandlung, AAV2-Infektion, Behandlung + Infektion),

25

wurden fünf Tiere aufgenommen. Die infizierten und nicht-infizierten Tiere wurden in separaten Isolatoren gehalten. Die Tumordurchmesser wurden wöchentlich gemessen und das Tumolvolumen wurde durch die Formel Tumolvolumen = $\frac{1}{2} \times \text{Breite} \times \text{Tiefe} \times \text{Höhe}$ bestimmt. Das relative Tumolvolumen (V/V_0) wurde für jedes Tier und jeden Zeitpunkt bestimmt (Verhältnis des Tumolvolumens [V] verglichen mit dem Tumor zu Beginn der Behandlung [V_0]).

Wie aus Figur 3 hervorgeht, führte die Behandlung mit Chemotherapeutika zu einer raschen Abnahme der Tumolvolumina und einer vollständigen Regression nach dreiwöchiger Behandlung. Die Kombination von Chemotherapie mit AAV2-Infektion führte zu einer rascheren Abnahme der Tumolvolumina verglichen mit Tieren, die nur eine Chemotherapie erhalten hatten, was eine Sensibilisierung der durch den Arzneistoff behandelten Tumorzellen durch AAV-2 anzeigt. Die Infektion mit AAV-2 alleine hatte keine signifikante Wirkung, und die Tumolvolumina nahmen in gleichem Umfang wie bei den unbehandelten Kontrollen zu. Die Behandlung wurde nach vollständiger Regression der Tumore unterbrochen und wurde bei einem Rezidiv wieder aufgenommen. Die Behandlung von Rezidiven war bei Tieren, die nur eine Arzneimittelbehandlung erhalten hatten weniger effektiv, verglichen mit der bei AAV-infizierten und chemotherapeutisch behandelten Tiere. Dies zeigt die Entwicklung einer Resistenz gegenüber der anfänglichen Behandlung bei mindestens der chemotherapeutisch behandelten Tiergruppe an. Die Rezidive in mit AAV-2 behandelten Tieren waren weiterhin gegenüber der Behandlung mit Cis-Platin und Etoposid empfindlich, aber die Tumorregression war langsamer verglichen mit der Regression der anfänglichen Tumore. In Woche 9 bildeten sich bei 3 von 5 mit AAV-2 infizierten Tieren die

Tumore vollständig zurück, im Gegensatz zu den Tumoren bei Tieren, die nur mit Chemotherapeutika behandelt wurden, wobei eine vollständige Regression der Tumore nicht induziert wurde.

PATENTANSPRÜCHE

- 1) Verwendung von adenoassoziierten Viren zur Senkung der radio- oder
5 chemotherapieinduzierten Resistenz bei Patienten, die an einem durch
Radio- oder Chemotherapie zu behandelnden Krebs leiden.
- 2) Verwendung nach Anspruch 1, wobei die adenoassoziierten Viren in einer
Dosis von 10^9 - 10^{10} AAV-Partikel/kg KG eingesetzt werden.
- 10 3) Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 2, wobei das adenoassoziierte Virus adenoassoziiertes Virus 2 (AAV-2) ist.
- 4) Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der durch Radio-
15 oder Chemotherapie zu behandelnden Krebs ein Colon-, Pankreas- oder
Hirntumor oder kleinzelliges Lungenkarzinom ist.
- 5) Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Verwendung
intravenös, kutan, oral oder intratumoral erfolgt.
- 20 6) Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Verwendung
vor, nach oder gleichzeitig zu einer Chemo- oder Radiotherapie erfolgt.
- 7) Pharmazeutische Zusammensetzung enthaltend ein Chemotherapeutikum
25 und adenoassoziierte Viren.

- 8) Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 7, wobei das Chemotherapeutikum Cis-Platin und/oder Etoposid ist.
- 9) Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 7 oder 8, wobei diese
5 eine Injektions- oder Infusionslösung, ein Aerosolspray oder eine Salbe ist.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Erfindung betrifft die Verwendung von adenoassoziierten Viren zur Senkung
5 der radio- oder chemotherapieinduzierten Resistenz bei Patienten, die an einem
durch Radio- oder Chemotherapie zu behandelnden Krebs leiden.

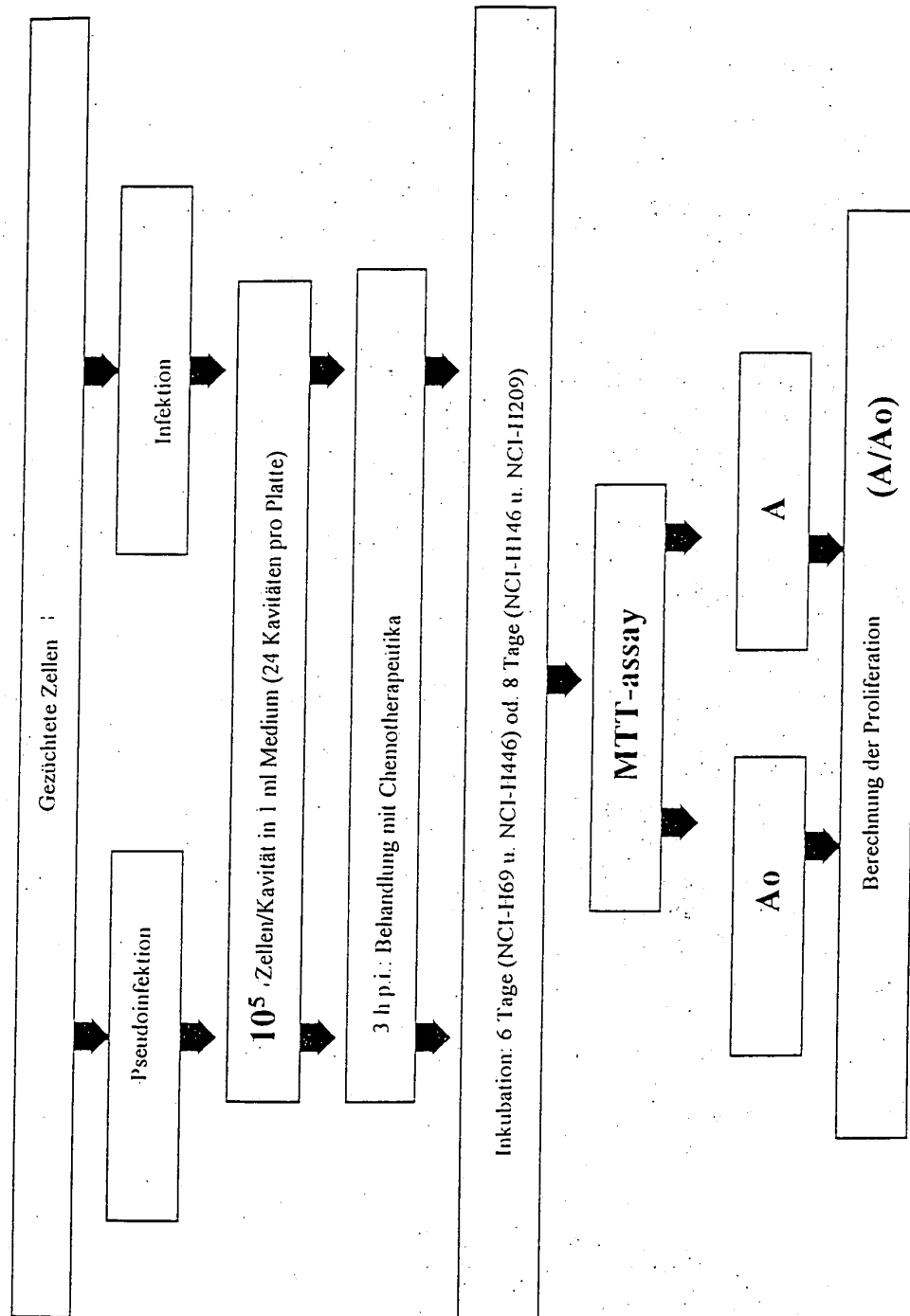


Fig. 1

NCI-H209

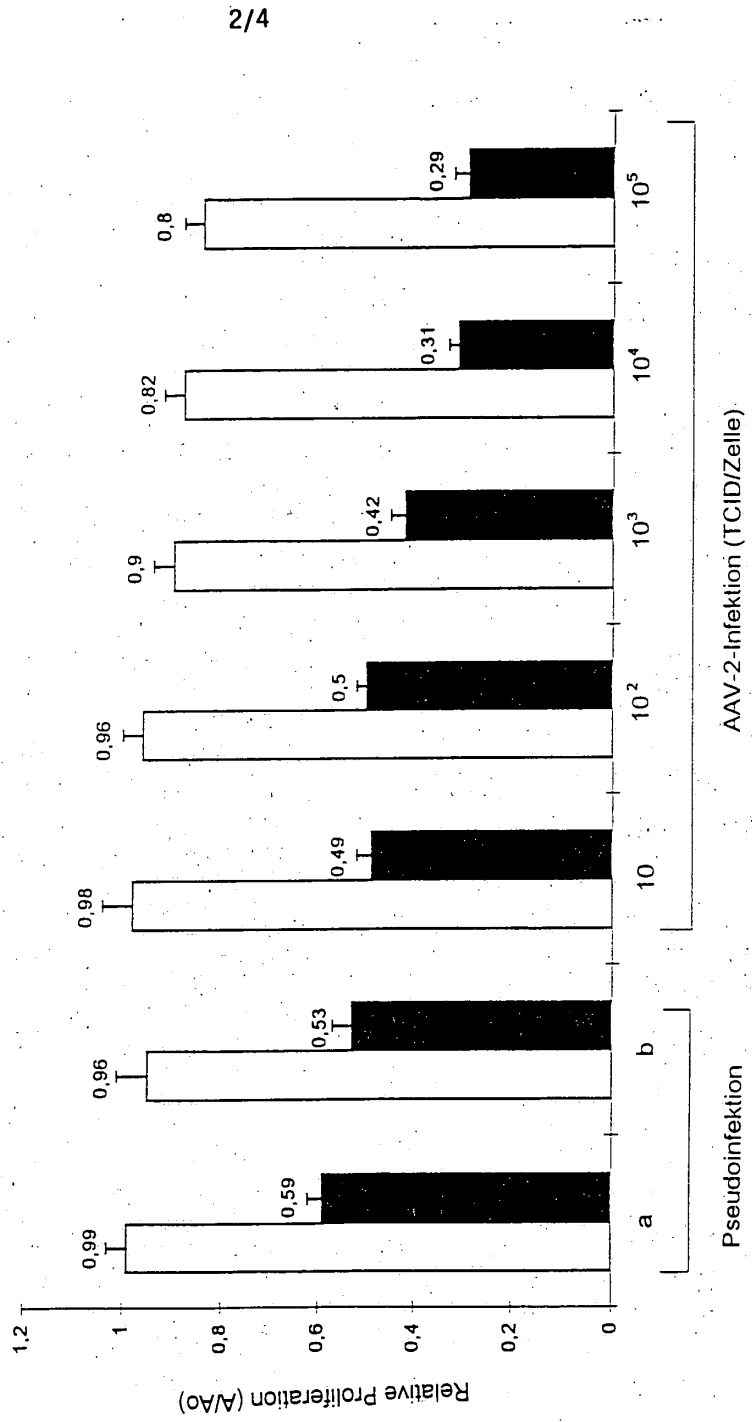


Fig. 2a

NCI-H446

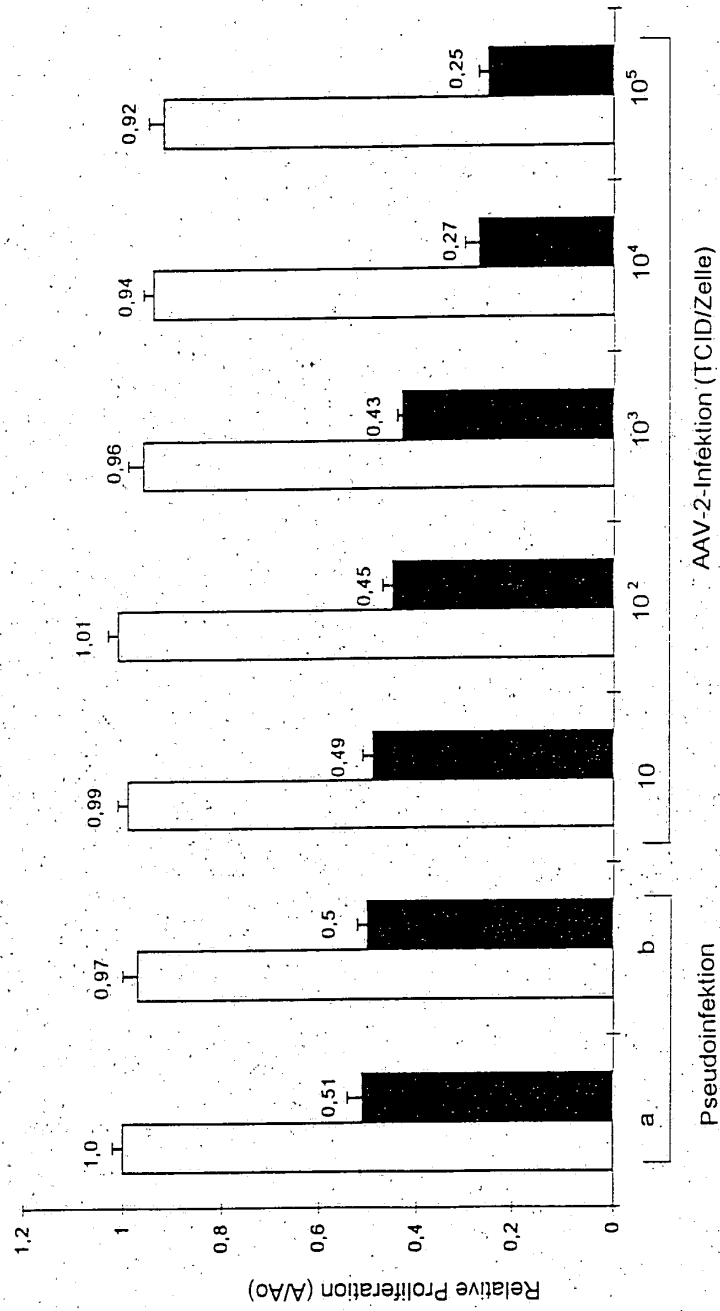


Fig. 2b

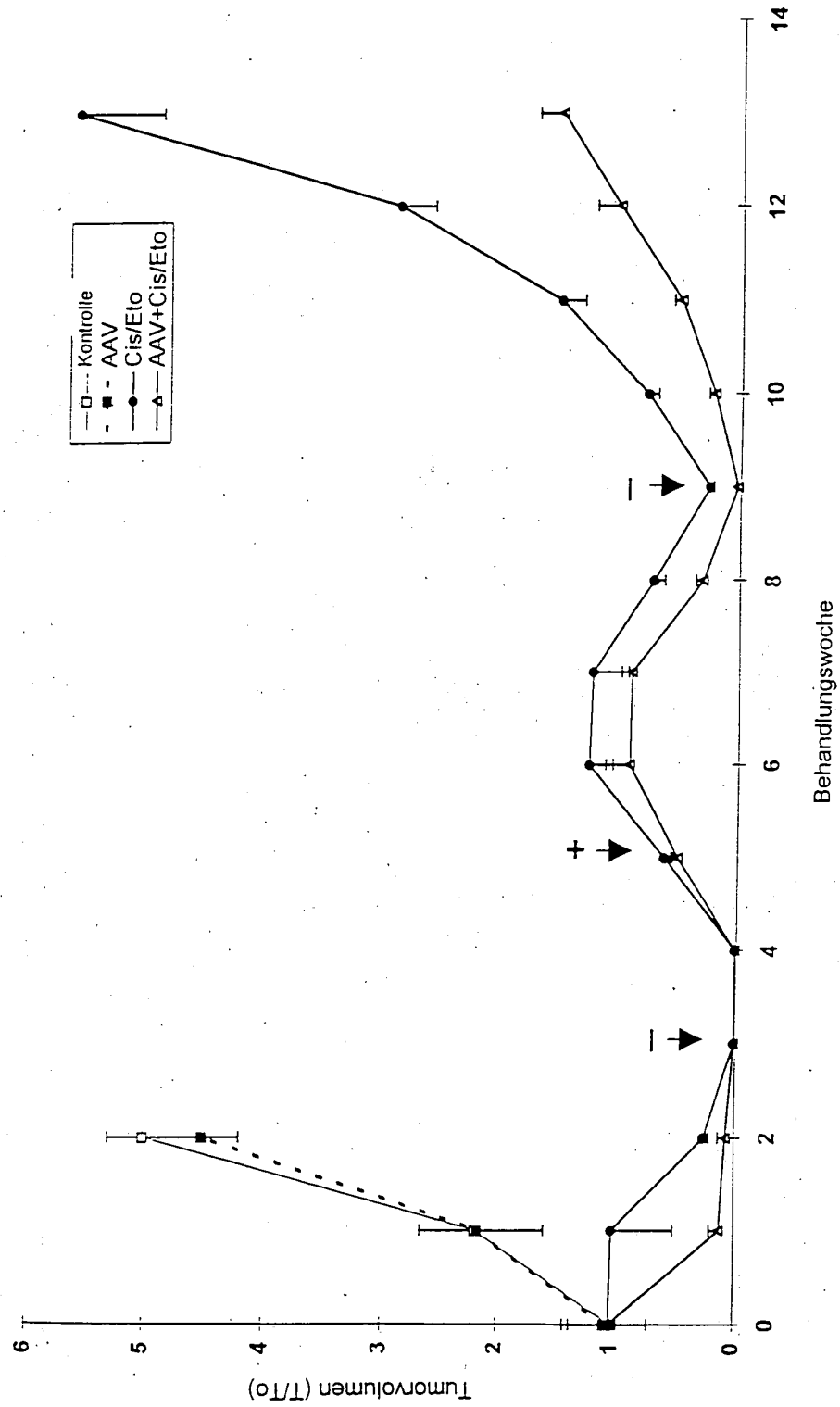


Fig. 3